

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 62-024150

(43)Date of publication of application : 02.02.1987

(51)Int.Cl.

G01N 33/68

G01N 31/22

(21)Application number : 60-163200

(71)Applicant : KONISHIROKU PHOTO IND CO LTD

(22)Date of filing : 24.07.1985

(72)Inventor : KAMIYAMA MIKIO
KOBAYASHI MORIO
HAGA ISAO
ARAI KAZUMI

(54) MULTILAYER ANALYSIS ELEMENT FOR ALBUMIN MEASUREMENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To make it possible to take the measurement of albumin in a biological liquid sample without being affected by other interfering protein such as globulin, by employing a compound that could cause a detectable color change when coupled to albumin under a specified pH condition.

CONSTITUTION: A compound that could cause a detectable color change when coupled to albumin under a specified pH condition is contained in such a manner as to be immovable in substance in a porous development layer within the layer and/or between layers. The compound that could cause a detectable color change when coupled to albumin includes a color indicator which causes a coloring reaction in color formation, decoloring, color vanishment or the like and a fluorescent indicator that presents a substantial change in the intensity of fluorescence, wavelength and the like being coupled to albumin. The color indicator is, for example, methyloange and the fluorescent indicator, for example, eosine Y. Preferably used among them is the color indicator such as methyloange. This enables the measurement of albumin in a biological liquid sample without being affected by other interfering protein.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-24150

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)2月2日

G 01 N 33/68
31/22

1 2 1

8305-2G
8506-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 アルブミン測定用多層分析素子

⑯ 特 願 昭60-163200

⑰ 出 願 昭60(1985)7月24日

⑱ 発 明 者	神 山 幹 夫	日野市さくら町1番地	小西六写真工業株式会社内
⑱ 発 明 者	小 林 守 夫	日野市さくら町1番地	小西六写真工業株式会社内
⑱ 発 明 者	葉 賀 功	日野市さくら町1番地	小西六写真工業株式会社内
⑱ 発 明 者	荒 井 和 巳	日野市さくら町1番地	小西六写真工業株式会社内
⑱ 出 願 人	小西六写真工業株式会 社	東京都新宿区西新宿1丁目26番2号	
⑱ 代 理 人	弁理士 市之瀬 宮夫		

明 細 書

1. 発明の名称

アルブミン測定用多層分析素子

2. 特許請求の範囲

液体不浸透性で、かつ、光透過性の支持体上に非蛋白質性親水性ポリマー層及び、多孔性展開層を順次積層して成る多層分析素子において、所定 pH 条件下でアルブミンと結合した時に検知可能な色変化を起こす化合物を、上記多孔性展開層中に層内及び／又は層間を実質的に移動しない形にして含有させた事の特徴とするアルブミン測定用多層分析素子。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は生物学的流体試料中の特定成分を定量する為の多層分析素子に関し、更に詳しくは生物学的流体試料中のアルブミンを定量する為の多層分析素子に関する。

〔発明の背景〕

従来、生物学的流体試料中の特定成分を分析す

る方法が多数開発されてきた。特に臨床化学の分野では種々の分析機器が開発され、多くの病院の臨床検査室等に導入されている。この中でも、特公昭 53-21877号明細書に開示された多層分析素子はその操作の簡便性、高い定量性から注目されている。

しかしながら、蛋白質、特にアルブミンの定量においては用いられる蛋白質結合染料のアルブミンに対する結合の特異性が小さい為、共存する他の蛋白質、例えばグロブリン等の妨害により誤差を受けやすい事が知られている。

この為、特開昭 57-50880号明細書では試薬層中に上記染料を含有せしめ、試料液中の蛋白質が展開層に残存し、試薬層中の染料、例えばプロモクレゾールグリーンが展開層に移行し、ここで蛋白質-プロモクレゾールグリーンとのコンプレックスを形成する。この際、pH及びプロモクレゾールグリーンの移行速度を調節する事で、アルブミンに対する染料の特異性が増大する事が開示されている。

又、特開昭58-179359号明細書では、光学的に検出可能な指示薬を担持した蛋白質吸着剤を、蛋白質を透過させうる非蛋白質性バインダー層中に含ませて試薬層とする方法が開示されている。

しかしながら、前者の方法はアルブミン以外の蛋白質との妨害を十分排除しているとはいいがたく、また、後者は製造面からも種々の困難が生じるものである事が明白である。

〔発明の目的〕

本発明の目的は、生物学的液体試料中のアルブミンを、例えばグロブリン等の他の妨害蛋白質の影響をうける事なく測定し、かつ製造面でも安定したアルブミン測定用多層分析素子を提供する事にある。

〔発明の構成〕

本発明の上記目的は、液体不浸透性で、かつ、光透過性の支持体上に非蛋白質性親水性ポリマー層及び、多孔性展開層を順次積層して成る多層分析素子において、所定 pH 条件下でアルブミンと結合した時に検出可能な色変化を起こす化合物を、

(4'-アルセノアニリノ)-2-クロロ-7-ノトキシアクリジン、フルオレスアミン、チアミン、1-(ジメチルアミノ)ナフトレン-5-スルホンクロリドなどが挙げられる。

これらのうちで特に好ましく用いられるものとしては、例えばノチルオレンジ、プロモクレゾールグリーン、プロモクレゾールパープル、プロモフェノールブルー等の呈色指示薬が挙げられる。

本発明に係る化合物は多孔性展開層中に実質的に層内及び／又は層間の移動がない形で含有される。

本発明に係る化合物を多孔性展開層中に含有せしめる方法としては、例えば特開昭57-197466

(米国特許第4,427,632号)に開示されたパラバの繊維と反応性基を有するポリマーバインダーとから成る多孔性展開層の場合、前記繊維に上記本発明に係る化合物をあらかじめ含浸させておくか、又は本発明に係る化合物を微分散させておく方法が有効である。

この時、本発明に係る化合物は含浸、微分散に

特開昭62-24150(2)

上記多孔性展開層中に層内及び／又は層間を実質的に移動しない形で含有させた多層分析素子を用いることにより達成される。

〔発明の具体的構成〕

本発明において、アルブミンと結合して検出可能な色変化を起こす化合物(以下、単に本発明に係る化合物という)とは発色、変色、消色などの呈色反応をする呈色指示薬及びアルブミンと結合して蛍光強度、波長等に大きな変化を示す蛍光指示薬が挙げられる。

呈色指示薬の具体例としては、ノチルオレンジ、プロモクレゾールグリーン、プロモクレゾールパープル、プロモフェノールブルー、アミドブラック10B、アシドオレンジR、バッファローブラック、オレンジG、アゾスルファチアゾール、2-ポトリルイジルナフトレン-6-スルホン酸などが挙げられる。

蛍光指示薬としては、例えばエオシンY、サフランインオレンジ、トリニトロベンゼンスルホン酸、1-アニリノナフトレン-8-スルホン酸、5-

かかわらず、反応性基を有するポリマー、例えばスチレン-グリシジルメタクリレート共重合体によって不動化される事になる。

又、特公昭53-21677(米国特許第3,992,158号)に開示された非繊維の等方的多孔性層(例えばブラッシュポリマー層)の場合、微分散により本発明に係る化合物を含有させる事が好ましい。

更に、特開昭55-164356に開示されている親水化処理をした織物の場合、織物に含浸した後、例えば上記共重合体で不動化の処理を行って用いる事が出来る。

しかしながら、これら多孔性展開層の中でも特開昭57-197466号に開示された展開層は製造上容易で、しかも含浸と微分散の両方を選択できる事から有用である。

本発明に係る化合物は多孔性展開層において約0.1g/m²から約5.0g/m²、好ましくは約0.5g/m²から約3.0g/m²の範囲で含有される。

更に、上記多孔性展開層の膜厚は約100ミクロンから約350ミクロンの範囲である事が好ましい。

特開昭62-24150(3)

この目的にそって展開層、非蛋白質性親水性ポリマー層、その他の機能層に酸、アルカリ、塩、緩衝剤、解離剤、界面活性剤等を適宜含有させることができる。

特にアルブミン分析においては、用いる本発明に係る化合物とアルブミンとの結合反応が pH によって大きく左右する為、その選択にあたっては慎重に行なわなければならない。

多孔性展開層中のアルブミンとの結合反応の pH は、用いられる本発明に係る化合物によって異なるが、一般に約 2.0 から約 7.0 の範囲、好ましくは pH 約 3.0 から約 6.5 の範囲である。pH をコントロールするための酸又は緩衝剤は、非蛋白質性親水性ポリマー層に含有されるが、必要に応じて該親水性ポリマー層以外の層に含有させる事が出来る。

例えば、本発明に係る化合物がプロモクレゾールグリーンの場合 pH は 4.0、プロモクレゾールパーブルの場合は pH は 5.2 が好ましい。

本発明の多層分析素子は支持体上に非蛋白質性

果を得るうえで重要である。

多孔性展開層中の pH をコントロールするために用いられる酸又は緩衝剤としては、例えば脂肪族ヒドロキシカルボン酸（例えば、グリコール酸、乳酸、 α -ヒドロキシ酪酸、グリセリン酸、タルトロン酸、りんご酸、酒石酸、くえん酸）、脂肪族ジカルボン酸（例えばマロン酸、こはく酸、3,3-ジメチルグルタル酸、 α,α' -ジメチルグルタル酸）、脂肪族カルボン酸（例えば酢酸、プロピオン酸、酪酸）、これらの塩と上記酸の組み合わせによる緩衝剤などが挙げられる。

好ましい酸又は酸とそれ自身の塩とを共に用いる緩衝剤としては、リンゴ酸、乳酸、コハク酸、マロン酸、クエン酸、酒石酸等が挙げられる。

本発明の多層分析素子に適用できる液体不浸透性で光透過性の支持体としては、約 200nm から約 900nm の範囲内の波長（1つの波長又は複数の波長）の電磁放射線（紫外線、近紫外線、可視光、又は近赤外線）を少なくとも約 40%、好ましくは少なくとも約 85% 透過し、且つ液体、例えば水を

親水性ポリマー層及び本発明に係る化合物を含有する多孔性展開層が積層されている。

上記非蛋白質性親水性ポリマー層を形成するために用いられる親水性ポリマーとしては、例えばポリアクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール等の合成ホモポリマー及びこれらの共重合体、カルボキシメチルセルロース・ナトリウム塩、ヒドロキシエチルセルロース、メチルセルロース等の親水性セルロース誘導体、アガロース、マレイン酸共重合体、ポリアクリル酸、ポリメタアクリル酸及びその塩、などが挙げられる。中でもアクリルアミドのホモポリマー及びコポリマーが好ましい。

本発明の多層分析素子において非蛋白質性親水性ポリマー層の膜厚は、一般に約 5ミクロンから約 50ミクロン、好ましくは約 10ミクロンから約 30ミクロンの範囲にある。

前述のアルブミンの定量にあたっては、pH、イオン強度などが重要な因子となるので、これらの因子を最適条件に設定する事は、良好な分析結

果的に透過させないフィルム状、シート状、薄板状又は他の形態の支持体であり、具体的には、セルロースアセテート、セルロースアセテートブチレート、セルロースアセテートプロピオネート、ポリエチレンテレフタレート、ポリスチレン、ポリカーボネート等のポリマー及びガラスが代表的な例として挙げられる。

本発明によれば、上記支持体に前記非蛋白質性親水性ポリマー層及び多孔性展開層を順次積層して、本発明の多層分析素子とされる。この際、支持体表面と該非蛋白質性親水性ポリマー層との接着性を改善する為に下引き層を設けるか、又は支持体表面を化学的処理（例えば酸処理、アルカリ処理）又は物理化学的処理（例えばコロナ放電処理、グロー放電処理、紫外線照射処理、火焰処理）を施す事が出来る。

本発明の多層分析素子の製造にあたっては、例えばスライドホッパー塗布法、浸漬塗布法、カーテン塗布法等種々の公知の方法を用いる事が出来る。更に、多孔性展開層が特開昭55-184350号に

特開昭62-24150(4)

開示されているように、親水化処理された織物の場合、例えば本発明の非蛋白質性親水性ポリマー層又は同様の素材から成り、該ポリマー層上に積層された接着層がそれぞれ半乾きの状態の時、又は親水性ポリマーを水、又は界面活性剤を含む水で湿潤させておいてから、展開層として用いる多孔性のシート状、フィルム状、又は膜状の素材を適当な圧力で上記層上に接着する事が出来る。

更に、本発明の多層分析素子の製造に当っては各層に各種界面活性剤を添加する事が出来る。用いることのできる界面活性剤としては、例えばアルキルフェノキシポリエトキシエタノール[例えば Triton X-100 (ロームアンドハース社)]、ポリエチレンオキシドアルキルエステル[例えばエマルゲン-120 (花王アトラス社)]、アルキルフェノキシグリセリン[例えばサーファクタント10G (オリーン社)]が代表的な例として挙げられる。

本発明の多層分析素子には、所望に応じて種々の機能の層及び層構成をとる事が可能である。例

移行しない事の確認を行った。

本発明の多孔性展開層(1)

キシレン84mlにトリトン(Triton) X-100 (ロームアンドハース(Rhone & Hass Co.)) 3.0g、スチレン-グリシジルメタアクリレート共重合体(9:1) 45gを溶解し、更にプロモクレゾールグリーン0.585gを混合し、ガラスビーズを入れ、サンドスターラーで5時間攪拌を行なって分散した後ガーゼでろ過し、分散液をガラスビーズからろ別した。この分散液30mlに対し粉末ろ紙C(東洋ろ紙(株)300メッシュ以上)を10.5g混合し、超音波分散を行った後、厚さ180ミクロンの下引き漬ポリエチレンテレフタレート支持体上に375ミクロンの間隙を有するドクターブレードを用いて塗布を行い、膜厚180ミクロン(乾燥時)の多孔性展開層を形成し、これを乾燥した。

本発明の多孔性展開層(2)

(プロモクレゾールグリーン含浸繊維の作成)

アセトン4.25ml及びキシレン40mlの混合溶媒にプロモクレゾールグリーン0.5gを加え攪拌溶解し

例えば特開昭51-40191(特公昭58-18628)、米国特許第4,110,079号、特開昭58-131565等に記載されている層及び層構成を任意に選択する事が可能である。

このようにして製造された多層分析素子は、分析方法に依存して種々の形状にする事が可能である。例えば所望の巾の伸長テープ、シート又はプラスチックマウントに装着されたスライドを含む種々の形状にする事が出来る。

本発明の多層分析素子は、多孔性展開層中に本発明に係る化合物が実質的に移動しない形で含有されているため、生物学的液体試料中のアルブミンを他の妨害蛋白質の影響をうけることなく測定できる。

以下に本発明の多層分析素子を実験例及び実施例をもって詳細に説明するが、これによって本発明が限定されるものではない。

実験例

本発明のアルブミン分析用多層分析素子において、本発明に係る化合物が層内及び/又は層間で

した後、純水4mlを加え攪拌を行ない、プロモクレゾールグリーンを水相に移行させる。ここに粉末ろ紙C(東洋ろ紙(株)300メッシュ以上)を17.4g加え、混合攪拌した後、静置する。上澄液にプロモクレゾールグリーンの着色がなくなった事を確認の後、ろ過し乾燥を行なう。

(多孔性展開層の作成)

キシレン84mlにトリトン(Triton) X-100 (ローム&ハース社) 3.0gとスチレン-グリシジルメタアクリレート共重合体(9:1) 4.5gを溶解した液に、上記プロモクレゾールグリーン含浸繊維28.9gを加え攪拌を行ないながら超音波を照射し分散液とした。この分散液を厚さ180ミクロンの透明な下引き漬ポリエチレンテレフタレート支持体上に375ミクロンの間隙を有するドクターブレードを用い塗布し、膜厚180ミクロン(乾燥時)の多孔性展開層を形成し、これを乾燥した。

(比較試薬層の作成)

更に比較として、特開昭57-50680号記載の要素製造に従い、180ミクロンの下引き漬ポリエチ

レンテレフタレート支持体上にポリアクリルアミド32.28g/㎡、プロモクレゾールグリーン1.08g、サーファクタント10G（オリーンマチエソン社）0.32g/㎡から成る試薬層を作成した。但し、ポリアクリルアミドが水に溶解しないようにポリアクリルアミドに対してホルムアルデヒド37%水溶液を1.0%添加した。

3種のフィルムを各々一定の面積になるように切り、蒸留水3mlに浸漬し各時間毎に $n=3$ で日分光光度計220-A型を用い435nmの吸光度を測定した。結果を表-1に表す。

以下余白

表-1

時間	1. 0分	2. 0分	3. 0分	4. 0分	5. 0分	6. 0分	7. 0分
本発明の膜層(1)	0.0132	0.0032	0.0102	0.0143	0.0087	0.0088	0.0078
本発明の膜層(2)	0.0241	0.0183	0.0214	0.0198	0.0199	0.0186	0.0173
比較試薬層 (特開昭57-50860号)	0.9721	0.8095	0.7939	1.0003	1.1237	1.2958	1.5001

上記表-1から、比較の特開昭 57-50860号記載の試薬層はすみやかに層中から呈色指示薬であるプロモクレゾールグリーンが移行しているが、本発明に用いられる多孔性膜層(1)及び(2)は呈色指示薬である染料が全く移行しない。又、浸漬中に上記フィルムを振とうさせても吸光度の結果に全く差が認められなかった事から、プロモクレゾールグリーンは層間、層内の移行は起こしていないものと考えられる。

実施例-1

本発明のアルブミン分析用多層分析素子として、下記の組成の塗布液を180ミクロンの下引と済の透明なポリエチレンテレフタレート支持体上に塗布した。

(非蛋白質性親水性ポリマー層)

ポリアクリルアミド10%水溶液 35gにクエン酸2.5g、エマルゲン120(花王アトラス社製)50%水溶液 5mlを加え、攪拌溶解した液に水酸化ナトリウム30%水溶液を加えてpH3.7に調整した後に、蒸留水で50mlにし、間隔 500ミクロンのドクター

ブレードを用いて厚さ 180ミクロンの透明な下引と済ポリエチレンテレフタレート支持体上に塗布し乾燥した。

(多孔性膜層)

前記、実験例で示した膜層(1)及び(2)の塗布液を前記で作成した非蛋白質性ポリマー層上に間隔 375ミクロンのドクターブレードを用いて各々膜厚 180ミクロンで(乾燥時)塗布し、乾燥した。これらを本発明の多層分析素子(I)及び(II)とした。

(比較多層分析素子の作成)

特開昭 57-50860号の記載に従って比較多層分析素子を作成した。

(試薬層)

ポリアクリルアミド 32.28g/㎡
プロモクレゾールグリーン 1.08g/㎡
りんご酸 5.4g/㎡
サーファクタント10G(オリーン社)0.32g/㎡

から成る試薬層

(膜層)

特開昭62-24150(6)

微結晶性セルロース 53.80g/㎡
 ポリビニルピロリドン 1.35g/㎡

から成る展開層

これらの多層分析素子は1.5cm×1.5cmに裁断し、中央に1cmの開孔部を有する2.4cm×2.8cmの直方形のプラスチックマウントに装着し、分析スライドとした。

上記の如くして作成した本発明の分析素子(Ⅰ)及び(Ⅱ)と比較分析素子とを用意し、検体として人血清アルブミンを2.0、3.5、5.0、6.5、7.5g/dℓになるように生理食塩水に溶解したもの及び上記のアルブミンレベルの標準液に更にヒトグロブリンを5%含む標準液を用意し、各々の分析素子の多孔性展開層上に10μℓの標準液を点着し37℃7分間インキュベーションを行った後、支持体側から545nmで反射濃度を測定した。結果を表-2に示す。

以下余白

表-2

検体	アルブミンレベル 2.0g/dℓ			アルブミンレベル 3.5g/dℓ			アルブミンレベル 5.0g/dℓ			アルブミンレベル 6.5g/dℓ			アルブミンレベル 7.5g/dℓ		
	アルブ ミンのみ	グロブ リン含む	ズレ (%)	アルブ ミンのみ	グロブ リン含む	ズレ (%)	アルブ ミンのみ	グロブ リン含む	ズレ (%)	アルブ ミンのみ	グロブ リン含む	ズレ (%)	アルブ ミンのみ	グロブ リン含む	ズレ (%)
本発明の分析素子(Ⅰ)	0.921	0.956	3.8%	1.092	1.113	1.9%	1.263	1.288	1.2%	1.434	1.464	2.1%	1.548	1.583	2.3%
本発明の分析素子(Ⅱ)	1.005	1.051	4.6%	1.210	1.268	4.8%	1.415	1.469	3.8%	1.620	1.665	2.7%	1.757	1.792	2.0%
比較分析素子	1.056	1.196	13.3%	1.214	1.327	9.3%	1.372	1.443	5.2%	1.530	1.600	4.6%	1.635	1.702	4.1%

表中のアルブミンのみはアルブミン標準液を滴下した時の反射濃度、
 グロブリン含むはアルブミン+グロブリン5%標準液の時の反射濃度、
 ズレはこの両者の差の百分率を示す。

特開昭62-24150(7)

表-2 から明らかなように本発明の多層分析素子は比較分析素子に比べて著しく妨害蛋白質の影響を低減させたものである事が判明した。

特許出願人 小西六写真工業株式会社
代理人 弁理士 市之瀬 宮夫 公認
弁理士